

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-84200

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)3月26日

C 12 Q 1/68  
C 07 H 21/04  
C 12 N 1/20

ZNA A  
B  
A

6807-4B  
7417-4C  
8515-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 22 (全19頁)

⑭ 発明の名称 カンピロバクターを検出するための核酸フラグメント、方法およびキット

⑯ 特 願 平1-177003

⑰ 出 願 平1(1989)7月7日

優先権主張 ⑱1988年7月7日⑲米国(US)⑳216679

㉑ 発 明 者 スーザン・エム・バーンズ アメリカ合衆国マサチューセッツ州01748, ホブキントン, メイブル・ストリート 5, アpartment ナンバー 2

㉒ 出 願 人 インテグレートッド・ジェネティクス・インコーポレートッド アメリカ合衆国マサチューセッツ州01701, フレイミングム, ニュー・ヨーク・アベニュー 51

㉓ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外4名

最終頁に続く

明 記 書

1. (発明の名称)

カンピロバクターを検出するための核酸フラグメント、方法およびキット

2. (特許請求の範囲)

1. 予め定められたストリンジェンシー条件下でカンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)、カンピロバクター・コリ(*Campylobacter coli*)およびカンピロバクター・ラリディス(*Campylobacter lariidis*)のrRNAまたはrRNA遺伝子にハイブリダイズし得る核酸フラグメント。

2. 緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大腸菌(*E. coli*)またはネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)のrRNAまたはrRNA遺伝子にハイブリダイズしない、請求項1記載の核酸フラグメント。

3. 領域124-225、領域391-501、領域973-1049、および領域1424-1489(*E. coli*の位置ナンバリング協定を使用)、並びにそれらの組合せより成る領域から選ばれた少なくとも10個の連続ヌクレオチドの少なくとも95%に相補的である、請求項1記

載の核酸フラグメント。

4. 領域124-225に相補的なフラグメントから成る、請求項3記載の核酸フラグメント。

5. 領域391-501に相補的なフラグメントから成る、請求項3記載の核酸フラグメント。

6. 領域973-1049に相補的なフラグメントから成る、請求項3記載の核酸フラグメント。

7. 領域1424-1489に相補的なフラグメントから成る、請求項3記載の核酸フラグメント。

8. プローブ345、プローブ346、プローブ999およびプローブ732より成る群から選ばれる、請求項4記載のフラグメント。

9. プローブ1104およびプローブ1105より成る群から選ばれる、請求項5記載のフラグメント。

10. プローブ1132、プローブ1133およびプローブ1130より成る群から選ばれる、請求項6記載のフラグメント。

11. プローブ351およびプローブ1134より成る群から選ばれる、請求項7記載のフラグメント。

12. プローブ732 配列、その相補的配列、およ

## 特開平2-84200 (2)

ビストリンジェント条件下で前記のものにハイブリダイズし得る配列より成る群から選ばれる配列を有する第一の核酸フラグメント；およびプローブ999配列、その相補的配列、およびストリンジェント条件下で前記のものにハイブリダイズし得る配列より成る群から選ばれる配列を有する第二の核酸フラグメントから成る、請求項3記載の核酸フラグメント。

13. プローブ1104配列、その相補的配列、およびストリンジェント条件下で前記のものにハイブリダイズし得る配列より成る群から選ばれる配列を有する第一の核酸フラグメント；およびプローブ1105配列、その相補的配列、およびストリンジェント条件下で前記のものにハイブリダイズし得る配列より成る群から選ばれる配列を有する第二の核酸フラグメントから成る、請求項3記載の核酸フラグメント。

14. プローブ1132、1133の配列、その相補的配列、およびストリンジェント条件下で前記のものにハイブリダイズし得る配列より成る群から選ば

れる配列を有する第一の核酸フラグメント；およびプローブ1130配列、その相補的配列、およびストリンジェント条件下で前記のものにハイブリダイズし得る配列より成る群から選ばれる配列を有する第二の核酸フラグメントから成る、請求項3記載の核酸フラグメント。

15. プローブ345、346、999、732、1104、1105、1132、1133、1130、351、1134および前記のもののいずれかに相補的なプローブ全部より成る群から選ばれるプローブにハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、請求項1記載の核酸フラグメント。

16. サンプル中のカンピロバクター(*Campylobacter*)の存在を検出する方法であって：

- a) 請求項3記載の核酸フラグメントとサンプルとを、該サンプル中に存在するならば、カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)、カンピロバクター・コリ(*Campylobacter coli*) および／またはカンピロバクター・ラリディス(*Campylobacter lariidis*)

のrRNAに該フラグメントをハイブリダイズさせる条件下で接触させて、ハイブリッド核酸複合体を形成させ；そして

- b) 該ハイブリッド複合体を、サンプル中のカンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コリおよび／またはカンピロバクター・ラリディスの存在の指標として検出することから成る上記方法。

17. 核酸フラグメントはプローブ345、346、999、732、1104、1105、1132、1133、1130、351、1134および前記のもののいずれかに相補的なプローブ全部より成る群から選ばれるプローブにハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る、請求項16記載の方法。

18. 核酸フラグメントはプローブ732、999および前記のもののいずれかに相補的なプローブ全部より成る群から選ばれるプローブにストリンジェント条件下でハイブリダイズし得る少なくとも1つのフラグメントと；プローブ732、999および前記のもののいずれかに相補的なプローブ全部

より成る群から選ばれるプローブにストリンジェント条件下でハイブリダイズし得る少なくとも1つの他のフラグメントと；の混合物から成る、請求項16記載の方法。

19. 核酸フラグメントはプローブ1104、1105および前記のもののいずれかに相補的なプローブ全部より成る群から選ばれるプローブにストリンジェント条件下でハイブリダイズし得る少なくとも1つのフラグメントと；プローブ1104、1105および前記のもののいずれかに相補的なプローブ全部より成る群から選ばれるプローブにストリンジェント条件下でハイブリダイズし得る少なくとも1つの他のフラグメントと；の混合物から成る、請求項16記載の方法。

20. プローブ1132、1133、1130および前記のもののいずれかに相補的なプローブ全部より成る群から選ばれる1以上のプローブにストリンジェント条件下でハイブリダイズし得る少なくとも1つのフラグメントと；プローブ1132、1133、1130および前記のもののいずれかに相補的なプローブ全

## 特開平 2-84200 (3)

部より成る群から選ばれるプローブにストリンジエント条件下でハイブリダイズし得る少なくとも 1 つの他のフラグメントと；の混合物から成る、請求項 16 記載の方法。

21. 少なくとも 1 つの容器に収容された請求項 1 記載の核酸フラグメント、およびサンプル中のカンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コーリおよび／またはカンピロバクター・ラリディスのグループの少なくとも 1 種の細菌の存在を検出する核酸フラグメントを利用するための説明書を含む、カンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コーリおよびカンピロバクター・ラリディス検出用のアッセイキット。

22. 少なくとも 1 つの容器に収容された請求項 3 記載の核酸フラグメント、およびサンプル中のカンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コーリおよびカンピロバクター・ラリディスのグループの少なくとも 1 種の細菌の存在を検出する核酸フラグメントを利用するための説明書を含む、カンピロバクター・ジェジュニ、カン

ピロバクター・コーリおよびカンピロバクター・ラリディス検出用のアッセイキット。

## 3. (発明の詳細な説明)

(産業上の利用分野)

本発明は、カンピロバクター(Campylobacter)属に属する細菌を検出することに関し、より詳細にはカンピロバクターの rRNA または rRNA 遺伝子を特異的に検出するための核酸プローブおよび組成物、並びにそれらの使用方法を提供する。

(従来の技術、発明が解決しようとする課題)

本明細書中で用いる“カンピロバクター”なる用語は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (N. R. Krieg および J. G. Holt [eds.], 1986, p. 111 ~ 118, Williams & Wilkins)においてそれとして分類された細菌を意味する。カンピロバクターの検出は種々の医学的および公衆衛生の状況下において重要である。カンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacter jejuni)および C. コーリ(C. coli)は 2 つの最も重要な細菌種であり、ヒトにおける下痢 (Blaser ら、1979, Ann. Intern.

Med. 91: 179) および腸炎 (G. K. Morris ら、編集、American Society for Microbiology, ワシントン, D. C.) の原因菌である。その他のカンピロバクター種はヒトや動物において流産、敗血症および増殖性腸腸炎のような疾病を起こすことに関係している。さらに、カンピロバクターに似ている微生物が同性愛の男性のふん便から (Fennell ら、1984, J. Infect. Dis., 149: 58) および胃潰瘍の生検材料から (Kasper ら、1984, Infection, 12: 179) 分離されている。

従って、本発明の 1 つの面は、一般に環境、食品または臨床サンプルに適用し得るカンピロバクターの迅速な新規アッセイ系を提供することである。

カンピロバクターは標準的な実験室手法に従って同定されている (Washington, J. A. [ed.], Laboratory Procedures in Clinical Microbiology, 第 2 版、ニューヨーク、Springer-Verlag, 1985 年、215 ~ 217 頁に記載の Campylobacter 参照)。

本発明の他の面は、慣例的な培養技術に伴う欠

点を回避し、核酸プローブを用いてカンピロバクターを検出することである。

本発明のさらに他の面は、通常のアッセイ条件下でプローブに接近しやすくなりうる模倣領域にハイブリダイズし得るプローブを提供することである。

Kohne ら (1968, Biophysical Journal 8: 1104 ~ 1118) は rRNA 配列に対するプローブの作製方法を論じているが、彼らはカンピロバクター特異的プローブを作製するのに必要な教示を与えていない。

Face および Campbell (1971, Journal of Bacteriology, 107: 543 ~ 547) は別種の細菌からのリボソームリボ核酸の相同性、およびそのような相同レベルを定量化するためのハイブリダイゼーション法を論じている。同様に、Sogin, Sogin, および Woese (1972, Journal of Molecular Evolution, 1: 173 ~ 184) は異なるリボソーム RNA 分子の一次構造の特性決定を利用して系統発生の関係を評価するための理論的かつ実際的な手法を

## 特開平2-84200 (4)

論じている。

Pox, PechmanおよびHoesle (1977, International Journal of Systematic Bacteriology, 27: 44~57) は原核生物系に対する1つの研究法として16S リボソームRNA の比較目録作成を論じている。しかしながら、これらの文献はカンピロバクターに関するKohne の教示の不備を補うことができない。

係属中の米国特許出願第692778号においてRashtchian およびFitts は、ゲノムDNA 配列を標的としたある種のカンピロバクター特異的核酸プローブの作製を論じているが、開示された方法は小さいオリゴヌクレオチドプローブの作製には適さないであろう。

本発明のさらに他の面は、カンピロバクターを特異的に検出する小型のオリゴヌクレオチドプローブを提供することである。Romaniukら (1987, J. Bacteriol., 159: 2137~2141)、Rashtchianら (1987, Current Microbiol., 14: 311~317)、Lauら (1987, System and Appl. Microbiol., 9:

231~238)、PasterおよびDewhirst (1988, Intl. J. System. Bacteriol., 38: 56~62)、並びにThompsonら (1988, Intl. J. System. Bacteriol., 38: 190~200) はカンピロバクターリボソームRNA の遺伝子機構を論じており、種々のカンピロバクターに由来する16S rRNA配列を提示している。しかしながら、これらの文献は最も興味のあるターゲット領域を検索して同定するのに役立たない。

RomaniukおよびTrust (1987, FEMS Microbiol. Lett., 42: 331~335) はカンピロバクター16S rRNA の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを開示しており、さらに電気泳動分離したカンピロバクターゲノムDNA の制限フラグメントへのサザンハイブリダイゼーションによるカンピロバクター株の同定におけるそのプローブの使用を証明している。このプローブは、この限定された状況において有用であるが、カンピロバクター菌と非カンピロバクター菌の混合集団を含むサンプル中のカンピロバクターを同定するのに十分な特異性をもち合わせていない。

リボソームは、遺伝情報を細胞タンパク質 (生命の主要な構造的および触媒的成分である) へ翻訳する唯一の既知装置として役立つので、全ての生物にとって極めて重要である。この重要性は全ての細胞がリボソームをもつという観測により証明される。

リボソームは3種の別個のRNA分子を含み、少なくとも大腸菌(E. coli)では、それらの分子は5S、16S および23S rRNAと呼ばれている。これらの名称の由来は沈降速度により測定されたRNA分子の大きさに関係している。しかしながら、実際には、それらは生物間で大きさが実質的に変化する。それにもかかわらず、5S、16S および23S rRNAは細菌の相同RNA分子のための一般名として普通に用いられており、ここでもこの慣例に従うことにする。

ハイブリダイゼーションは、予め決められた反応条件下で、2つの部分的に又は完全に相補的な1本鎖核酸が逆平行状態で一緒になって、特異的で安定した水素結合により2本鎖核酸を形成する

方法として、一般に理解されている。特定の組のハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシー(stringency)はプローブ/ターゲット2本鎖の塩基組成、並びに2つの核酸間の錯対合(mispairing)のレベルおよび形状によって定められる。ストリンジエンシーはまたハイブリダイゼーション溶液中に存在するイオン種の濃度および種類、存在する変性剤の種類および濃度、ハイブリダイゼーション温度のような反応パラメーターによっても支配される。一般に、ハイブリダイゼーション条件がよりストリンジエントになるにつれて、安定したハイブリッドを形成するために、より長いプローブが好適になる。結果的に、ハイブリダイゼーションが行われる条件のストリンジエンシー (例えば、実施しようとするアッセイの型に基づく) は使用する好適なプローブの条件を指定するであろう。このような関係は当業者によく理解されており、容易に操作することができる。一般的な事として、プローブの長さに応じて、当業者はストリンジエント条件を約0.9モルの塩溶液中

## 特開平 2-84200 (5)

約35～65℃であると理解している。

本明細書中で用いる“プローブ”とは、予め定められたストリンジエンシーの条件下でターゲット塩酸配列に特異的に（すなわち、優先的に）ハイブリダイズされる特定のヌクレオチド配列を含む、考案または選別によって、合成されたあるいは生物学的につくられた酢酸（DNA またはRNA）を意味する。ターゲット塩酸配列とは特定のプローブが優先的にハイブリダイズし得るものである。その他の有用な定義は、それらが以下の説明文中で最初に出てきたときに、説明されるであろう。ここに引用した文献はすべて参照によりここに包含される。

（課題を解決するための手段）

本発明の種々の原理および側面によれば、特定のハイブリダイゼーション条件下で、カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）、*C. コーリ*（*C. coli*）および*C. ラリディス*（*C. laridis*）のリボソームRNA（rRNA）分子の存在を検出できるが、被検サンプル中に存在する他の関連細菌の

rRNAを同一条件下で検出できないDNA またはRNA配列から成る核酸プローブおよびプローブセットが提供される。適切な被検サンプルには例えばふん便、血液、他の体液または組織、並びに食品および動物からの生物学的サンプルもしくは物質が含まれる。

本発明のプローブは多数の遺伝子学的に異なるグループのカンピロバクターを同定するために用いられる。これらは表1に示され、主なグループはボックスで囲むことによって分類されている。これらのグループの中でいくつかの再分割が可能であり、それはサブグループ間の間隔をあけることによって示される。*C. jejuni*、*C. coli*および*C. laridis* —臨床（ふん便）被検物および汚染食品からの単離物の大部分を占めるカンピロバクター種—は別個のグループを形成する。それらは互いに密接な関係があり、他のカンピロバクター種とは（16S rRNAヌクレオチド配列の変異のパターンおよび程度において）区別される。他の3つのカンピロバクターグループにはウオリネラ（*Wolinella*）

属、バクテロイデス（*Bacteroides*）属、チオブラム（*Thiovulum*）属およびフレキシスピラ（*Flexispira*）属の代表菌を含む非カンピロバクター菌が多数混在している（表1参照）。

ここに記載のプローブは主に*C. jejuni*、*C. coli*および*C. laridis* グループの細菌とハイブリダイズする。対象となる臨床、食品および環境サンプル中の他のカンピロバクター種と比較して、それらは圧倒的に広く行き渡っており、且つそれらは遺伝学的に区別し得るので、このカンピロバクターグループに特異的なプローブが最も重要となる。

本発明はまたこれらのプローブを利用するアッセイ系を特徴としており、その好適な方式は上記の望ましいプローブの挙動を有利に増強することができる。本発明のアッセイ系は、カンピロバクターを検出するための現在利用されている他の方法に対して、有利にも次の増強された性能を示す：

a) 感度の増加；すなわち、現在用いられている方法よりも頻繁に所定のサンプル中のカンピロバクターを検出する；

b) 安価な試薬の使用および労力の軽減により有意なアッセイコストの低下が見込まれる；

c) 生化学的にまれなカンピロバクターでさえも正確に同定できる；および

d) 試験がそれ以上増殖させる必要のない非培養サンプルに対して実施されるので、結果がより迅速に得られる。従って、本発明の好適な試験は、有利にも結果を得るのにたった1日かかるだけである。

本発明プローブをrRNAに向けることによって生じる他の利点には、検出されるrRNAが細胞塊の重要な成分を構成するという事実が含まれることが判明した。細胞のリボソーム含量の概算は変化するが、活発に増殖しているカンピロバクター菌は細胞当たり $5.0 \times 10^8 + 3$ より多いリボソームを含み、それ故に $5.0 \times 10^8 + 3$ コピー数のそれぞれのrRNA（リボソーム中に1：1：1の化学量論量で存在する）を含むうる。対照的に、遺伝子またはそのRNA転写物のような他の細胞ターゲット分子は、それらが比較的少ない量で存在するので、あまり

## 特開平 2-84200 (6)

望ましくない。

別の予期しない利点は、rRNA（およびそれらをコードする遺伝子）が同時に存在する生物間で側方転移（lateral transfer）を受けないように思われる点である。従って、rRNAの一次構造は、遺伝子特異的ターゲット（例えば、同時に存在する生物間で側方転移を受けやすいプラスミド由来の遺伝子またはその産物の場合でありうる）ではなく、生物特異的分子ターゲットを与える。

さらに、本発明は多数のカンビロバクター（上記のもの）を識別しうるカンビロバクター-rRNAターゲット配列に対するプローブを提供する。臨床、食品および環境サンプルから最も普通に分離されるカンビロバクター種の *Caampylobacter jejuni*、*C.coli* および *C.laridis* の rRNA ターゲット領域にハイブリダイズしうる 2 種のプローブの好適な混合物も提供される。有利には、これらの rRNA ターゲット配列は、本発明の好適なアッセイ条件下で、本発明プローブがカンビロバクター-rRNA とハイブリダイズするが、非カンビロバクター-rRNA とはい

たカンビロバクター種のサブグループ間の関係を示す。この表はここに記載のプローブおよびプローブセットの変異性（包括性）を理解するための有用な枠組みを提供する；

表 2a-d カンビロバクター 16s rRNA のヌクレオチドターゲット配列、および本発明プローブのヌクレオチド配列（*E.coli* の位置ナンバリング協定を使用、Brosius ら、1978、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*: 75: 4801~4805）並びに *Mollinella*、*Bacteroides*、*Flexispira* および *Thiovulum* を含む他の関連細菌からの 16s rRNA の関連部分の整列を示す。*E.coli* 配列もターゲット領域の位置を確認するために示される。RNA 配列は 5'→3' の方向に書かれており、プローブ配列は DNA であって 3'→5' の方向に書かれている。いくつかのプローブに含まれる小文字 c は修飾されたシトシン残基（用いるアッセイの型に応じて、そのシトシン残基にリポーター基が結合されうる）を示す；

般にハイブリダイズしないように、大部分の非カンビロバクター-rRNA と十分に異なるものである。これらのプローブの特徴は包括性および排他性としてそれぞれ定義される。カンビロバクターに関して本発明プローブの驚くべき包括性および排他性の特徴を有するプローブが形成され得るという発見は意外なことであって、予測できないことであった。

本発明の特に好適な実施態様では、みん便被検物中の *Caampylobacter jejuni*、*C.coli* および *C.laridis* を検出するアッセイ法が提供される。この試験は迅速であり、感度がよく、非放射性であり、ハイブリダイゼーション工程に先立ってサンプル中の細菌を培養する必要がなく、しかも上記のカンビロバクターに対し非常に特異的である。

#### 表の簡単な説明

本発明の原理および側面は表を参照することによりさらに理解されるであろう；

表 1 カンビロバクター 16S rRNA に存在する配列変異のパターンの分析に基づいて発見され

表 3 サイトドット (cyt-dot) 法で試験したカンビロバクターおよび非カンビロバクター株の代表的サンプルに対する好適なプローブの包括性および排他性挙動を示す。

本発明プローブの開発において取られた第一工程は、カンビロバクター特異的核酸プローブのターゲット部位として役立つ 16s rRNA の領域を同定することを含んでいた。実際のこととして、被検サンプル中にどの非カンビロバクター菌が存在するかを推論的に予知することは困難である。このような非カンビロバクター菌が非常に多く存在しうするために、所定のプローブの十分な排他性を証明することは極めて困難であり、多大の労力を要し、しかも予測できない結果のものである。プローブを用いて最終的にスクリーニングされる全ての被検サンプル中にどのような非カンビロバクター菌が存在しうるかを、検索および開発の初期段階において、知る必要性を回避するために、より厳格な基準が採用された。これはカンビロバクター間の、およびカンビロバクターと他の細菌

## 特開平2-84200 (7)

グループとの間の、系統発生的関係の知識を必要とした。排他性の基準は、もしも代表的な発生上近縁のカンピロバクター類縁体のrRNAの相同領域と十分に異なるカンピロバクターrRNA中の特定のターゲット領域が同定されるならば、このような配列に対するプローブは、カンピロバクターと類縁体とをハイブリダイゼーション検定により識別するために使用できるであろうと定めることにより満たされる、という操作上のしかし以前には証明されていない仮説が採用された。系統発生的観察に基づいて、その後、より遠縁の生物のrRNA配列は、たとえそれらの実際の本性が必ずしも知られていなくても、上記の発生上近縁のカンピロバクター類縁体よりも配列の特定領域が予想どおりに異なるであろうと推定された。しかしながら、そのような領域が存在するかどうか、またそれらが存在するとしても、このような領域がrRNAのどこに位置するのか、について推論的に予知することはできない。

核酸ハイブリダイゼーションプローブの有用な

ターゲット部位として役立つカンピロバクターrRNAの領域を同定するための第一工程として、多数のカンピロバクター種からの16s rRNAのほぼ完全なヌクレオチド配列が決定された(表2参照)。これらはカンピロバクター属の系統発生樹を代表するものとして選ばれた。rRNAのいろいろな部分のヌクレオチド配列は、クローニング(Maniatisら、1982、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー研究所、ニューヨーク、p.545)、およびrRNAをコードする遺伝子の塩基配列決定(Maxam & Gilbert、1977、Proceedings of the National Academy of Science、USA 74: 560 ~ 564; Sangerら、1977、Proceedings of the National Academy of Science、USA 74: 5463 ~ 5467)、および/または逆転写酵素を用いるrRNA自体の直接的塩基配列決定(Laneら、1985、Proceedings of the National Academy of Science、USA 82: 6955 ~ 6959)により標準実験室プロトコルを用いて決定された。

このようにして得られたヌクレオチド配列は相

互に、および他の入手しうるrRNAヌクレオチド配列と、特に表1に示した細菌から誘導されたものと、比較した。表2に示した配列の好適な領域は、これらの種に対して有用な包括性および排他性を示しうるものとして同定された。

それぞれの核酸プローブは、先に論じた望ましい特徴が実際に得られたかどうかを厳密に立証するために別の実験を行った: すなわち、1) 近縁種を含めた全ての非カンピロバクター属に対する十分な排他性; 2) カンピロバクター株に対する有用な包括性パターン; および3) 実際に用いられる種々のアッセイ条件下でのターゲット領域の接近容易性。これらのプローブの排他性(特に極めて多種類の非カンピロバクター属が豊富に存在するふん便サンプルにおける排他性)および包括性(カンピロバクターの15種およびバクテリウムグループ、並びに多数の“カンピロバクター様細菌”程度の包括性)を定めるのに関係しうる生物が極めて多数存在するので、使用可能なプローブを検定して選別するために反復戦略が採用された。培養生物の

パネルを検定するほかに、適当な排他性挙動をより厳密に証明すべく、約75のカンピロバクター培養陰性ふん便試料がプローブを用いてスクリーニングされた(実施例1-特異的)。プローブはApplied Biosystems装置で標準ホスホリアルミダイト法(Caruthers、M.H.ら、1983、Gene Amplification and Analysis、編集Papas、T.S.、Rosenberg、M.、Charikjian、J.G.、発行 Elsevier、ニューヨーク、3巻、1 ~ 26頁)により都合よく合成できた。

“ドットブロット(dot blot)”分析は、公知方法に従って、これらの第一作製プローブの包括性および排他性を予備的に試験するために用いられた。知られているように、ドットブロット分析は一般にこの目的のために特別に市販されているニトロセルロース、ナイロンまたはその他の誘導体化膜のようなフィルター上に核酸もしくは核酸塩基を固定化することを包含する。DNAまたはRNAはこのようなフィルター上に容易に固定され、その後いろいろな核酸ハイブリダイゼーション条件

## 特開平2-84200 (8)

(すなわち、ストリンジエンシー) 下で対象の核酸プローブによるハイブリダイゼーションについて調べられる。ターゲット配列に対してスクレオチド配列の相補性がより大きいプローブは、相補性がより小さいプローブよりも、高レベルのハイブリダイゼーションを起こすであろう。ここに記載のオリゴスクレオチドプローブ(すなわち30~36スクレオチド)の場合、60℃で14~16時間(0.9 M NaCl、0.12 M Tris-HCl、pH7.8、6 mM EDTA、0.1 M KPO<sub>4</sub>、0.1% SDS、0.1% ビロホスフェート、0.002% フィコール、0.02% BSA および 0.002% ポリビニルピロリドンを含むハイブリダイゼーション溶液中) rRNA ターゲットにハイブリダイズさせ、続いて未結合プローブを除くために60℃で(0.03 M NaCl、0.004 M Tris-HCl、pH7.8、0.2 mM EDTA および 0.1% SDS を含む溶液中) 15分間ずつ3回ポストハイブリダイゼーション洗浄を行うことが、表および実施例に示した特異性および感度のレベルを得るのに十分なストリンジエンシーであるだろう。粗製(未精製)溶菌液中に存在するDNAまたはRNA

が対象の核酸を初めに精製しないで固定化され得る技法(ここではサイトドットと呼ぶ、例えば Maniatis, T., Fritsch, E. F. および Sambrook, J., 1982, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* を参照) も利用できる。この後者の手法は特定の核酸中に存在しうる特定の生物のスクレオチド配列をスクリーニングするのに要する労力を相当に低減させ、さらに多数の生物のマススクリーニングを有利に行わせしめる。従ってそれは多数の生物に対する核酸ハイブリダイゼーションプローブの排他性および包括性スクリーニングのための最適な方法である。

カンピロバクターを含むサンプル中に存在しうる細菌の型を示す非カンピロバクター菌の一覧表を実施例4に示す。先に述べたように、このように広い表示の細菌に対して良好な排他性を示すプローブは、より広い表示のより遠縁の腸内細菌に対して同様にふるまうことが予測される。この予測は実施例1-特異的(ここでは好適なプローブ(好適なアッセイ系を使用)が試験した75のカン

ピロバクター培養陰性みん便の検検物のうち75に存在する非カンピロバクター菌のいずれとも交差反応しなかった)に示すデータによって裏付けられる。

いくつかの他の事柄もプローブの最適なデザイン特性に影響を及ぼす。第一の考慮すべき事柄はプローブ自体に関するプローブの形状(すなわち、分子内相互作用)である。16s および 23s rRNA の有用なターゲット配列は、大抵の場合、自己相補性の多大の可能性を示す領域に位置することが見出された。その結果、これらの領域に対するプローブは十分に長くなければならず、またターゲット分子それ自体の二次構造と競うに適した形状をしていなければならない。第二に、このような(明確な構造をもつ)ターゲット領域に対するプローブもまた自己相補性を示すことがある。プローブとターゲット配列との起こりうる相互作用は、ターゲットまたはプローブ配列のそれら自体への分子内アニーリングを支配するパラメーターと同じ型のパラメーターによって支配されるので、自

己相補的のプローブは、特に溶液ハイブリダイゼーション条件下で、それらのターゲット配列へのハイブリダイゼーションのために接近し難くなるかもしれない。従って、プローブデザインの1つの重要な面はこのような自己相補性を最小限度に抑えることである。それにはカンピロバクター特異的配列の最大利用と許容しうるプローブ形状との間で妥協することが必要になる。

プローブデザインにおける第二の考慮すべき事柄は包括性の基準に関して生起する。好適なプローブは、適当な排他性挙動を示すが、全ての希望するカンピロバクター菌のrRNAにハイブリダイズし得るものである。カンピロバクター属それ自体は様々な表現型および遺伝子型(後述するように、rRNAを含む)を示す細菌から成るので、“理想的”なプローブのデザインは非常に困難なことである。実際に、単一の“普遍的”なカンピロバクタープローブを検索するよりもむしろ、それぞれのプローブが有用な水準の包括性と共に適当な排他性を示す一組のカンピロバクター特異的のプローブを検



## 特開平2-84200 (9)

索する方が好ましい。全体として、好適なプローブセットは理想的には大部分または全部のカンビロバクターを検出するが、非カンビロバクター菌を検出しないであろう。このようなプローブセットでは、例えば、一方のプローブが1つまたは2、3の重要なカンビロバクター株以外の全部を検出でき、他方のプローブが第一プローブによって検出されなかった2、3のカンビロバクター株にのみハイブリダイズできる。こうして、下記のプローブは包括性に関して個々に特徴づけられるが、先に詳述した特異的プローブの“セット”の概念は好ましくは、個々のプローブの重要性を定める際に、およびアッセイキットを作製する際に考慮されることが理解されるであろう。

プローブのデザインおよび分析の最終工程は、実際の（例えば、食品/臨床/環境）サンプルを試験し、その後望ましい性質が実際のアッセイ条件下で最適化されるように、最終的なプローブセット用の適当なプローブを選択することから成っている。

理解されるであろう。

表2Aはカンビロバクター16S rRNAの124~225領域（E.coliの位置の番号付けを使用）をターゲットとした4種のプローブを示す。345および346と呼ばれるプローブはまたそれぞれAR197およびAR196という名称のもとで同定された。両方のプローブはカンビロバクター属の細菌由来のrRNAに特異的にハイブリダイズすることが立証された。いくつかの高感度アッセイ系において、プローブ345および346は通常のふん便サンプル中に存在する若干の非カンビロバクター菌に対して望ましくない交差ハイブリダイゼーションを示し、従ってこれらのプローブはあまり好ましくない。別の配列分析に基づいて、プローブ999および732が考案されて、試験された。これらは“親”プローブよりも短かく（プローブ345および346が50ヌクレオチド長であるのに対して、それぞれ31および35ヌクレオチド長である）、またそれらは16S rRNA 124~225領域に存在するカンビロバクター特異的配列位置の異なる部分を利用しているため

## プローブ

前記のプローブ選択の戦略はサンプル中のカンビロバクター菌を同定するのに有用なプローブを数多くもたらした。表の簡単な説明の項で概説したように、表2は代表的なカンビロバクター株のrRNA中のそれらのターゲット部位において整列されたプローブ配列を示す。表2A~2Dは好適なプローブを詳述するものである。

表3は種々のカンビロバクターおよび非カンビロバクター菌の“サイトプロット”に対するプローブのハイブリダイゼーション挙動を示す。この実験では、プローブは検出および定量化のために<sup>32</sup>Pで放射性標識された。ハイブリダイゼーション条件は上述したハイブリダイゼーション溶液中60℃で14~16時間ハイブリダイズさせることから成っていた。

しかしながら、より高度なストリンジェンシーのアッセイ系を用いる場合は、同程度の感度（ハイブリダイゼーション効率）を維持するために、より長いプローブの使用が望ましいことは容易に

に、このターゲット領域の熱力学的に有利な二次構造に対してプローブ345および346とはやや異なる関係を有している。全体として、プローブ999および732は有利にもカンビロバクターのターゲット種（C.jejuni、C.coliおよびC.laridis）に対して等しい（すなわち、完全な）包括性を示し、かつプローブ345および346によって示されたものに比べて改良された排他性を示す。プローブ999および732は非-C.jejuni、C.coliおよびC.laridisへの有意に少ないハイブリダイゼーションを示すが、これは目下好適なアッセイ系において改良された排他性を与える許容しうる妥協のため（また、ふん便中の種々のカンビロバクター種の相対的発生率-C.jejuni>C.coli>C.laridis>>>他の全てのカンビロバクターのため）であると考えられる。

それ故に、プローブ732および999は前記の包括性および排他性挙動のために、そしてまたそれらの見掛け感度のために、ここに記載された最適なプローブである。プローブ732および999のハ

イブリダイゼーション挙動は表3および実施例1～4に詳述される。表3はサイトドット法での個々のプローブの挙動を示す。実施例1～4は最適の二重特異的液体ハイブリダイゼーションにおいて併用されたプローブのハイブリダイゼーション挙動を詳述している。

二重特異的アッセイ系（以下で詳述する一実施例1）では、ポジティブの結果を得るために両方のプローブのハイブリダイゼーションが必要であることに気づく。従って、このアッセイ系においては、いずれかのプローブ単独による望ましくないハイブリダイゼーション（すなわち、非カンピロバクターへのハイブリダイゼーション）の影響が無くならないにしても、有意に減ぜられる。

表2Bはカンピロバクター16S rRNAの391～501領域（*E. coli*の位置の番号付けを使用）をターゲットとした、1104および1105と呼ばれる2つのプローブを記述している。プローブ1104はこれまでに試験した全ての*C. jejuni* (5)、*C. coli* (3)および*C. laridis* (5)にハイブリダイズし、さらに部分的に

同定された臨床分離物（主として*C. jejuni* 62のうち58にハイブリダイズする。それはまた全てではないにしても多数の他のカンピロバクター種にもハイブリダイズする。試験した非カンピロバクターのうち、*H. curva*のみがプローブ1104によって有意な程度に検出される。プローブ1105はこれまでに試験した全てのカンピロバクター株および種にハイブリダイズする。それはまた表1および2に示した*Bacteroides* および*Molinitella* 株にもハイブリダイズするが、腸内細菌株の*E. coli*、*S. typhimurium*（ネズミチフス菌）などにはハイブリダイズしない。プローブ1105またはその誘導体は、そのハイブリダイゼーション挙動により、表1に示したカンピロバクターおよび“類縁菌”の全グループの同定／検出に最も役立つ“広範囲特異的”プローブでありうる。この全グループは、いろいろな遺伝子および生化学的基準によって、他の全ての細菌から完全に区別されることに留意されたい。天然サンプル（例えば臨床、食品または環境サンプル）中のそのグループの細菌の存在

を検出するのに有用なプローブまたはプローブセットは、これらのまだ十分には解明されていない細菌の発生および疫学を研究する上で、価値ある検索手段となるだろう。非-*C. jejuni*、*C. coli*および*C. laridis*の多くは分離または培養するのが非常に困難であるので、環境中でのそれらの伝播またはヒトや動物の病気とそれらとの関係についてはあまり知られていない。これらのプローブはこのような理解を得るのに有用な道具として役立つであろう。

表2Cはカンピロバクター16S rRNAの973-1049領域（*E. coli*の位置の番号付けを使用）をターゲットとした、1130、1132および1133と呼ばれる3種のプローブを記述している。全てのプローブは試験した*C. jejuni*、*C. coli*および*C. laridis*に対して十分な包括性を示し（表3）、さらに62全部の臨床分離物を検出する。少数の非-*jejuni*、*coli*または*laridis*カンピロバクター株への限定されたハイブリダイゼーションが使用したハイブリダイゼーション条件下でこの領域に対して3種のプ

ローブすべてによって示される。これらのプローブはすべて優れた排他性挙動を示し、カンピロバクター特異的のプローブとして極めて有用であるように思われる。

プローブ1132および1133は1つの位置でのみ相違することに注意されたい。この相違はこの位置でのターゲットカンピロバクター間に観察された異質性(heterogeneity)を反映している。

表2Cの説明文中で最初に言及した類似体-Cは、そのC-4位置が1,3-プロパンジアミン側鎖で修飾された2'-デオキシシチジンである(Schulman, L.H.ら、1981, *Nucl. Acids Res.*, 9, 1203～1217)。この化合物はCaruthersによって開発された固相合成法を用いてDNAプローブに組み込むことのできるホスホルアミダイトに転化される(Caruthers, M.H.ら、1982, *Genetic Engineering*, Sellen, A. およびHollaender, J.K. (編纂), Vol. 4, p. 1～17, Plenum Press、ニューヨーク)。その後この第一アミンは、例えば合成オリゴヌクレオチドの検出に用いられるピオチンまたはフルオレセ

## 特開平2-84200 (11)

ンリガンドにより、選択的に誘導体化される

(Rashchian, A.ら、1987、Clin. Chem., 33/9, 1526~1530)。

表2DはプローブAR351として先に記載された351を含む2種のプローブを記述している。他方のプローブ1134はプローブ351から誘導されたものであってプローブ351より短い。カンピロバクター16S rRNA中の同一の新規構造要素を利用している。351および1134は両方ともカンピロバクター16S rRNAの1424-1489領域をターゲットとしている。表2Dにおいて、プローブ351および1134のターゲット配列の中央付近に、カンピロバクターrRNAはこの領域のE.coli配列に対して6ヌクレオチドの保存的欠失をもつことに注目されたい。E.coliの構造は大多数の真正細菌によって示される構造を代表しており、従ってプローブ1134をカンピロバクターに対し特異的なものになっている。カンピロバクター間およびカンピロバクターとBacteroides, Helicobacter などとの間に見られるこの欠失部位近辺の更なるヌクレオチド変異は、プロ

ーブ1134および351のハイブリダイゼーションをカンピロバクターのC.jejuni, C.coliおよびC. lariidis グループに限定するのに役立っている。

2.3 の他のカンピロバクターへの若干の限定されたハイブリダイゼーションがドットプロットにおいて検出されるが(表3)、非カンピロバクターへのハイブリダイゼーションは全く検出されない。実施例1-全体的：ホモポリマー捕獲、二重プローブ液体ハイブリダイゼーション法

カンピロバクターおよび/または非カンピロバクター菌を含む培養物を適当な培地で増殖させ、次いで多数の適当な溶菌剤(例えば、NaOH、グアニジン塩、洗剤、酵素処理、またはそれらのいくつかの組合せ)のうちいずれかをを用いて核酸を放出させる。ハイブリダイゼーションは2つの異なるプローブまたはプローブセット(そのうちの少なくとも1つは、両方である必要はないが、検出しようとする生物に特異的でなければならない)を用いて実施される。本実施例において、カンピロバクター特異的“捕獲”プローブ732はその3'

末端に20~200デオキシアデノシン(dA)残基を酵素的に付加され、そしてリポータープローブ999は捕獲されたターゲット分子を検出するための放射性リン(<sup>32</sup>P)または他の小型リガンド(例えば、フルオレセインまたはビオチン、この実験では前者を用いる)で化学的または酵素的に標識される。

一般的に、培養/純化後、被検サンプル中に存在する細菌は少量のアリコートに分けて試験管に移す。溶菌した後、捕獲および検出用プローブを加え、以下(実施例1-特異的)に示すような適当な溶液中適当な温度でハイブリダイゼーションを進行させる。その後、ターゲット/プローブ複合体を含む溶液は15~3000ヌクレオチド長のデオキシチミジン(dT)を結合させた表面に、dAとdTをハイブリダイズさせる条件下で接触させる。本実施例では、ターゲット/プローブ溶液中に浸漬させるプラスチック製の“浸漬片(dipstick)”にdTを結合させた。カンピロバクターリボソームRNAが被検サンプル中に存在する場合、dA付加したカ

ンピロバクター特異的捕獲プローブは存在するターゲットrRNA配列にハイブリダイズし、続いて浸漬片上に捕獲されるであろう。ハイブリダイズされなかった核酸および細胞破片は以下で述べるように洗い落とされ、dA-dT2本鎖によって表面に結合された捕獲DNA-RNA複合体が残る。リポータープローブもまた、正しいターゲット核酸が存在するときだけ、相互作用の真一捕獲表面-dT:dA-捕獲プローブ:ターゲット:リポータープローブを介して浸漬片に結合される。結合されたリガンド誘導体化(例えば、フルオレセイン化)リポータープローブはその後、リガンド結合性酵素複合体(例えば、本実施例では西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗フルオレセイン抗体)の添加により検出される。検出複合体の特異的結合を可能にする条件下でインキュベーションし、未結合酵素を洗い落とし、発色性基質を添加し、その結果として発色させ(一般には20~30分)、場合により発色終止液を加えた後、色の濃さを比色定量法により測定する。この読取り(一般には0.1~2.0

吸光単位の範囲)はネガティブ対照レベルと比較し、閾値またはカットオフ値を定め、そして実験レベルの“有意性”の決定を行う。

#### 実施例1—特異的

臨床ふん便検体の場合、サンプル1gをカンビロバクターふん便処理緩衝液(3.25M グアニジンチオシアネート、0.4M Tris-HCl(7.5)、0.08M EDTA、13% デキストラン硫酸5000、0.325%サルコシル)3mlに加えて、サンプルが均質になるまでボルボックス混合した。

それぞれのハイブリダイゼーションのために処理済みサンプル0.70mlを使用した。各サンプルから放出された核酸は0.05mlの特異的な捕獲/検出プローブ(1.0 μg/mlの好適な捕獲プローブ732および0.5 μg/mlの検出プローブ999-FITCを含む)の添加により検出した。捕獲用浸漬片をそれぞれの試験管(溶液液と特異的プローブを含む)に入れた。内容物は37℃の水浴中で60分間インキュベーションして、特異的捕獲/リポータープローブのターゲット核酸へのハイブリダイゼーション、

インキュベーションした。その後浸漬片を取り出し、0.25mlの4N硫酸を加えて発色段階を終わらせた。サンプルの吸光度は波長450nmの光線を用いて比色定量法により測定した。

OD値が0.1以上のサンプルはカンビロバクターに対し陽性であると見なされ、それより低い吸光度をもつサンプルはカンビロバクターの不在を示していた。上記のように試験した148のふん便検体から得られた結果を以下に示す：

		培養物	
		陽性	陰性
本発明アッセイ	陽性	(確認+) 71	(誤認+) 0
	陰性	(誤認-) 2	(確認-) 75

$$\text{感度} = \frac{(\text{確認}+)}{(\text{全培養物}+)} \times 100 = \frac{71}{71+2} \times 100 = 97\%$$

$$\text{特異性} = \frac{(\text{確認}-)}{(\text{全培養物}-)} \times 100 = \frac{75}{75+0} \times 100 = 100\%$$

(≡は“と定義される”という意味である)

#### 特開平2-84200 (12)

およびこれらの特異的DNA / rRNAハイブリッドの上記浸漬片への捕獲を行わせた。

ハイブリダイゼーション後、浸漬片はその活性dI被覆部分をおおうのに十分な洗液(50mM Tris、pH7.5、150mM NaCl、2mM EDTA および0.1% Tween 20、室温)を含む洗浄浴中に1分間浸漬することにより洗った。

洗浄した浸漬片は洗浄浴から取り出し、吸収紙で吸い取って乾かし、0.75mlの抗体-酵素複合体(抗フルオレセイン-西洋ワサビペルオキシダーゼを洗浄緩衝液で希釈したもの)を含む1組の試験管に入れ、その後室温で20分間インキュベーションを行った。

抗原-抗体反応を起こさせた後、浸漬片を試験管から取り出し、先の2つの段落において記載した方法と同じ方法で洗浄し、乾かした。その浸漬片は基質-色原体混合物(酸素-ペルオキシド：テトラメチルベンジジン [Ventrex、メイン州ポートランド)、2:1)を含む1組のラベルを付けた試験管に入れ、室温で20分間インキュベーション

#### 実施例2

異なる濃度のC. jejuniを播種した陰性採集ふん便に対して上記方法を繰り返した。次の結果が得られた：

播種濃度 CFU/ml	吸光度 450nm
0	0.01
$1 \times 10^4$	0.13
$1 \times 10^5$	0.36
$1 \times 10^6$	0.73
$1 \times 10^7$	1.50

本発明はrRNAの検出について記載されたが、ここに記載のプローブおよびそれらに相補的なプローブはrRNAをコードする遺伝子(DNA)を検出する際にも有用であることが容易に理解されるであろう。従って、このようなプローブはここに記載のプローブの均等物であると考えられ、本発明の精神および範囲並びに特許請求の範囲に含まれるものである。

#### 実施例3

実施例1の方法に従って、カンビロバクター単離物を陰性の採集ふん便に $10^7$ CFU/mlの濃度で

## 特開平2-84200 (13)

“捕獲”し、好適な液体ハイブリダイゼーション法で捕獲プローブ732 および検出プローブ999-FITCを用いて試験した。掲載した細菌株の供給源は表3に示す通りである。得られた結果は次の通りであった：

微生物	供給源	吸光度 450nm
C. jejuni (C. ジュジュニ)	33560	1.03
C. jejuni (C. ジュジュニ)	N933	0.99
C. jejuni (C. ジュジュニ)	29428	0.90
C. laridis (C. ラリディス)	UA487	1.05
C. laridis (C. ラリディス)	UA577	1.04
C. laridis (C. ラリディス)	35223	0.89
C. coli (C. コーリ)	33559	0.88
C. coli (C. コーリ)	84-29	0.83
C. fetus fetus (C. フェータスフェータス)	33246	0.12
C. fetus venerealis (C. フェータスベネレリス)	33561	0.08
C. hyointestinalis (C. ヒオインテスティナリス)	35217	0.10
C. mucosalis (C. ムコサリス)	43264	0.09
C. spurius (C. スプリアム)	33562	0.14
C. cryaerophilia (C. クリアエロフィリア)	43157	0.06
C. pylori (C. ピロリ)	43504	0.03

## 実施例4

実施例3の方法に従って、非カンピロバクター単離物を陰性の採集ふん便に10<sup>8</sup>CFU/皿の濃度で“捕獲”し、捕獲プローブ732 および検出プローブ999-FITCを用いて好適な液体ハイブリダイゼーション法により試験した。掲載した細菌株の供給源は表3に示した通りであり、さらに同はSilliker Laboratories (イリノイ州シカゴ) である。

観察された結果は次の通りであった：

微生物	供給源	吸光度 (450nm)
Acinetobacter calcoaceticus	(ア) 15606	0.01
Aeromonas hydrophilia	(ア) 7965	0.01
Alcaligenes faecalis	(ア) 8750	0.01
Bacillus cereus	(ア) 14579	0.00
Bacteroides fragilis	(ア) 23743	0.01
Bacteroides gracilis	(ア) 33236	0.01
Bacteroides molianinogenicus	(ア) 25845	0.02
Bacteroides thetaiotaomicron	(ア) 27941	0.03
Bacteroides ureolyticus	(ア) 33387	0.01
Bifidobacterium bifidum	(ア) 35914	0.00
Candida albicans	(ア) 16804	0.03
Candida glabrata	(ア) 2001	0.03
Candida stellatoidiae	(ア) 36232	0.00
Candida tropicalis	(ア) 750	0.00
Citrobacter diversus	(ア) 27156	0.00
Citrobacter freundii	(ア) 5135	0.00
Clostridium difficile	(ア) 9689	0.01
Clostridium perfringens	(ア) 3624	0.01
Clostridium sordellii	(ア) 9714	0.01
Edwardsiella tarda	(ア) 15947	0.02
Enterobacter aerogenes	(ア) 13048	0.01
Enterobacter agglomerans	(ア) 5121	0.01
Enterobacter cloacae	(ア) 5134	0.03
Escherichia coli	(ア) 12036	0.01
Fusobacterium mortiferum	(ア) 9817	0.01
Hafnia alvei	(ア) 29927	0.01
Klebsiella oxytoca	(ア) 13182	0.01
Klebsiella pneumoniae	(ア) 13182	0.01
Morganella morganii	(ア) 13182	0.01
Neisseria gonorrhoeae	(ア) 25830	0.00
Peptococcus asaccharolyticus	(ア) 9793	0.00
Peptococcus magnus	(ア) 22743	0.00
Peptostreptococcus anaerobius	(ア) 23328	0.03
Plesiomonas shigelloides	(ア) 27337	0.00
Propionibacterium acnes	(ア) 14029	0.00
Proteus mirabilis	(ア) 6919	0.03
Proteus vulgaris	(ア) 13109	0.01
Providencia alcalifaciens	(ア) 13315	0.01
Providencia rettgeri	(ア) 9886	0.01
Providencia stuartii	(ア) 9844	0.01
Pseudomonas aeruginosa	(ア) 29914	0.04
Salmonella typhimurium	(ア) 16928	0.00
Serratia marcescens	(ア) 23566	0.00
Shigella dysenteriae	(ア) 972	0.01
Staphylococcus aureus	(ア) 970	0.00
Streptococcus faecalis	(ア) 12600	0.00
Vibrio parahaemolyticus	(ア) 19433	0.00
Yersinia enterocolitica	(ア) 17802	0.02
	(ア) 33238	0.00
	(ア) 35224	0.00
	(ア) 25943	0.02
	(ア) 9610	0.01

## 特開平2-84200 (14)

表1: カンピロバクター &amp; “類縁菌” 間の16S rRNAの関係

<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter coli</i> <i>Campylobacter lariidis</i>
<i>Campylobacter fetus</i> <i>Campylobacter hyointestinalis</i> <i>Holinella recta</i> <i>Holinella curva</i> <i>Bacteroides gracilis</i> <i>Bacteroides ureolyticus</i> <i>Campylobacter sputorum</i>
<i>Campylobacter cryaerophila</i> <i>Campylobacter nitrofigilis</i>
<i>Campylobacter cinaedi</i> <i>Campylobacter fennelliae</i> <i>Plexispira rappini</i> <i>Thiovulum</i> <i>Holinella succinogenes</i> <i>Campylobacter pylori</i>

表2 A: カンピロバクター16S rRNAのプロープターゲット部位124-225

位置 #	124	225
<i>E. coli</i>	CUGGG-AAACUGCCUGAUGGAGGGGUAACUACUGGAAACGGUAGCUAAUACCCGAUAACGUC-----GCAA-----GACCAAGAGGGGGACCUUCGGGCCUUGCCAUC	
<i>C. jejuni</i> 1	AUAGUUAAUCUGCCUACACAAGAGGACACAGUUGGAAACGACUGCUAAUACCUUACUCCUUAACACAAGUUGAGUAGGGAAG-----UUUUU-----CGGUGUA	
<i>C. jejuni</i> 2	AUAGUUAAUCUGCCUACACAAGAGGACACAGUUGGAAACGACUGCUAAUACCUUACUCCUUAACACAAGUUGAGUAGGGAAG-----UUUUU-----CGGUGUA	
<i>C. jejuni</i> 3	AUAGUUAAUCUGCCUACACAAGAGGACACAGUUGGAAACGACUGCUAAUACCUUACUCCUUAACACAAGUUGAGUAGGGAAG-----UUUUU-----CGGUGUA	
<i>C. coli</i>	AUAGUUAAUCUGCCUACACAAGAGGACACAGUUGGAAACGACUGCUAAUACCUUACUCCUUAACACAAGUUGAGUAGGGAAG-----UUUUU-----CGGUGUA	
<i>C. lariidis</i>	AUAGUUAAUCUGCCUACACAAGAGGACACAGUUGGAAACGACUGCUAAUACCUUACUCCUUAACACAAGUUGAGUAGGGAAG-----UUUUU-----CGGUGUA	
ブロープ 345		GAGATATGAGGACGAATTGTGTTCACTCATCCCTTTC-----AAAAA-----GCCACAT
ブロープ 346	TCAATTAGACGGGATGTGTTCTCTGTTGTCAACCTTTGCTGACGATTAT	
ブロープ 999		GACGATTATGAGATATGAGGACGAATTGTGT
ブロープ 732	CAATTAGACGGGATGTGTTCTCTGTTGTCAACCT	
<i>C. fetus</i> f	AUAGUUAAUCUGCCUACACUGGAGGACACAGUUGGAAACGACUGCUAAUACCUUACUCCUUAACACAAGUUGAGUAGGGAAG-----UUUUU-----CGGUGUA	
<i>C. hyoint</i>	AUAGUUAAUCUGCCUACACUGGAGGACACAGUUGGAAACGACUGCUAAUACCUUACUCCUUAACACAAGUUGAGUAGGGAAG-----UUUUU-----CGGUGUA	
<i>C. cryaero</i>	AUAGCUAAUACUCCUUAACUAGGGAUAAACAUUGGAAACGAUUGCUAAUACCUUACUCCUUAUUAACCUAAGUUAUAGGGAAGA-----UUUA-----UUGGUAA	
<i>Thiovulum</i>	AUAGUUAAUCUGCCUACUUGGAGGACACAGUUGGAAACGACUGCUAAUACCUUACUCCUUAUUAACCUAAGUUAUAGGGAAGA-----UUUU-----CGGUGUA	
<i>H. succino</i>	AUAGCUAAUACUCCUUAACUAGGGAUAAACAUUGGAAACGAUUGCUAAUACCUUACUCCUUAUUAACCUAAGUUAUAGGGAAGA-----UUUU-----CGGUGUA	
<i>F. rappini</i>	AUAGCUAAUACUCCUUAACUAGGGAUAAACAUUGGAAACGAUUGCUAAUACCUUACUCCUUAUUAACCUAAGUUAUAGGGAAGA-----UUUU-----CGGUGUA	
<i>C. pylori</i>	AUAGCUAAUACUCCUUAACUAGGGAUAAACAUUGGAAACGAUUGCUAAUACCUUACUCCUUAUUAACCUAAGUUAUAGGGAAGA-----UUUU-----CGGUGUA	

## 特開平2-84200 (15)

**説明** 16S rRNAは5'→3'方向に書かれており、プローブ配列はDNAとして3'→5'方向に書かれている。16S rRNA配列はE.coli配列(プローブターゲット領域を確認するための基準として用いられる)に対して整列させてある。E.coli配列の上の数字はE.coli 16S rRNA配列の5'末端から数えたヌクレオチド残基の番号を意味する。C,A,G,Uはそれぞれリボヌクレオチド塩基のシトシン、アデノシン、グアノシンおよびウリジンを表す。RNA配列中の文字W,Y,M,HおよびNは不確定のヌクレオチドの指定を表す:すなわちW=AまたはU、Y=CまたはU、M=CまたはA、H=A,CまたはU、N=A,C,GまたはU。RNA配列中の小文字はその位置でのヌクレオチドの存在の不確定を示す。破線はヌクレオチドがその配列のその位置に存在しないことを示す整列ギャップである。プローブ345は米国特許出願第821393号に記載されるプローブAR197に相当し、そしてプローブ346はプローブAR196に相当する。

**微生物の説明** E.coli=GenBank Data Base から

のEscherichia coli配列;C.jejuni 1=Campylobacter jejuni N941株、マサチューセッツ大学メディカルセンター(マサチューセッツ州ウスター)、Gary Doernからの臨床単離物;C.jejuni 2およびC.jejuni 3はそれぞれアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)から供給された29428株および33560株である;C.coli=Campylobacter coli ATCC33559株;C.laridis=Campylobacter laridis ATCC35223株;C.fetus f=Campylobacter fetusのfetus 亜種5396株(フランス、パリ、パスツール研究所のコレクション)、恒人的関係のP.Romanlukからの配列;C.hyoint=Campylobacter hyointestinalis ATCC35217株;C.cryaero=Campylobacter cryaerophila ATCC43157株;Thiovulum細胞はD.Stahlによって増菌培養物から単離され(Stahlら、1987、Intn'l J.System. Bacteriol., 37:116~122を参照)、D.StahlおよびD.Laneによって塩基配列が決定された(Romanlukら、1987、J.Bacteriol., 169:2137~2141に報告されている);W.succino=Morli-

nella succinogenes (Lauら、1987、System. & Appl. Microbiol., 9:231~238からの配列);F.rappini=Flexispira rappini 1937-38264株、ナショナル・アニマル・ディーズ・センター(アイオワ州アメス)、J.Brynerによって提供された細胞;C.pylori=Campylobacter pylori ATCC 43504株。

特開平2-84200 (16)

表2B:カンピロバクター16S rRNAのプロローブターゲット部位391-501

	391	501
E.coli	GCAGCCAUGCCGCGUGAUGAAGAAGGCCUUCGGGUGUAAAGUACUUUACGCGGGAG-GAAGGAGUAAAGUAAUACCUUUGCUCAUUGACGUUACCCGCAAG-AAGC	
C.jejuni 1	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----UCUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.jejuni 4	GCAGCAUAGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----UCUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.jejuni 5	GCAGCAUAGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCG-AAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----UCUNHNGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.jejuni 6	GCAGCAUAGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----UCUNHNGGUACCUAAGGAAU-NA..	
C.coli	GCAGCAUAGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----UCUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.coli 2	GCAGCAUAGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----UCUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.laridis	GCAGCAUAGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----UCUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.laridis2	GCAGCAUAGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----UCUGHNGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
ブローブ 1104	TcTCCCTT-CITTA-----AGACTGCCATGGATTCTCTTA-TTC	
ブローブ 1105	TcTCCGCGCACCTCTCTACTGTGAAAGCCTCGCATTTGAGGAAAGC	
C.fetus 1	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAC-----CAUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.fetus 2	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAC-----CAUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.hyoit	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAC-----CAUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.conciscus	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----NAUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
H.curva	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAA-----UUUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
H.recta	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----NUUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
B.gracilis	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----AAUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
B.ureolyt	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----AAUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.sputorum1	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----AAUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.sputorum2	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAAU-----AAUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.cryaero	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAUA-----AUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.cryaero2	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAUA-----AUA...	
C.nitrofig	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAUA-----AUA...	
Thiovulus	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GaUU-----AUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
H.succino	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAUA-----AUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.cinaedi	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAUA-----AUA...	
C.fennell	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAUA-----AUA...	
F.rappini	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAUA-----AUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	
C.pyloxi	GCAGCAACGCCGCGUGGAGGAGUACACUUUUCGAGCGUAAACUCCUUUUUAGGGAA-GAUA-----AUGACGGUACCUAAGGAAU-AAGC	

説明 微生物の説明および配列の表記法は表2Aと同じであるが、次の説明を追加する: C.jejuni 5 = *Campylobacter jejuni* UVIC株 (ブリティッシュ・コロンビア大学 (ブリティッシュ・コロンビア州バンクーバー)、P.Romaniukから個人的関係により提供された); C.jejuni 6 = *Campylobacter jejuni* NCTC 11392 株 (P.Romaniuk); C.coli 2 = *Campylobacter coli* NCTC 11366 株 (P.Romaniuk); C.laridis 2 = *Campylobacter laridis* ATCC35221 (Romaniukら、1987およびThompsonら、1988からの配列のD.Laneによる混合物); C.fetus 1 = *Campylobacter fetus* の fetus 亜種 VPI 11641 株 (Paster & Dewhirst, 1988)、ATCC27374 (Thompsonら、1988)、およびCIP5396 (Romaniukら、1987)からの逆転写配列のD.Laneによる混合物; C.fetus 2 = *Campylobacter fetus* の venereal 亜種 ATCC 19438 株 (Thompsonら、1988) および未同定株 (P.Romaniuk、個人的関係)の混合物; C.conciscus = FDC (Forsyth Dental Center) 288 株、FDC484 株 (マサチューセッツ州ボストン、ホーサイス・デ

ンタル・センター、B.Paster & F.Dewhirst、個人的関係) および ATCC13086 株 (Thompsonら、1988) から誘導された *Campylobacter conciscus* 混合物; H.curva = *Hollinella curva* ATCC35224; H.recta = *Hollinella recta* ATCC33238; B.gracilis = *Bacteroides gracilis* ATCC33236; B.ureolyt = *Bacteroides ureolyticus* ATCC33387; C.sputorum1 = ATCC33562 株 (表2Aで定義されたC.sputorum) および ATCC33491 株から誘導された *Campylobacter sputorum* の bubulus 亜種の混合物; C.sputorum 2 = S-17 株 (Thompsonら、1988) および (Romaniukら、個人的関係) から誘導された *Campylobacter sputorum* の sputorum 亜種の混合物; C.cryaero 2 = *Campylobacter cryaerophilus* ATCC11885 (Thompsonら、1988); C.cinaedi = *Campylobacter cinaedi* ATCC35683 (Thompsonら、1988); C.fennell = *Campylobacter fennelliae* ATCC35684 (Thompsonら、1988); S=C または G (スクレオチド指定における不確定)。



表 2 C : カンピロバクター 16S rRNA のプローブターゲット部位の 973-1049

位置	973	1049
<i>E. coli</i>	GAAGAACCUUACCGGGUUGACAUCACCGAAGUUUUCAGAGAUAGAAUGUG-CC--UUCG--GGAACCGUGAGACAGGU	
<i>C. jejuni</i> 1	GAAGAACCUUACCGGGUUGAUUCCUUAAGAACCUUUUAGAGAUAGAGGGUG-CUAGCUUUCUAGAACUUAAGAGACAGGU	
<i>C. jejuni</i> 2	GAAGAACCUUACCGGGUUGAUUCCUUAAGAACCUUUUAGAGAUAGAGGGUG-CUAGCUUUCUAGAACUUAAGAGACAGGU	
<i>C. jejuni</i> 3	GAAGAACCUUACCGGGUUGAUUCCUUAAGAACCUUUUAGAGAUAGAGGGUG-CUAGCUUUCUAGAACUUAAGAGACAGGU	
<i>C. coli</i>	GAAGAACCUUACCGGGUUGAUUCCUUAAGAACCUUUUAGAGAUAGAGGGUG-CUAGCUUUCUAGAACUUAAGAGACAGGU	
<i>C. lariidis</i>	GAAGAACCUUACCGGGUUGAUUCCUUAAGAACCUUUUAGAGAUAGAGGGUG-CUAGCUUUCUAGAACUUAAGAGACAGGU	
ブローブ 1132		TCTATATCTCCAC-GATCGAACGATCTTGAATCTCTGc
ブローブ 1133		TCTATCTCTCCAC-GATCGAACGATCTTGAATCTCTGc
ブローブ 1136		
ブローブ 1130	TcTCTGGGAATGGACCGGAAGTATAGGATCTCTGGAAc	
<i>C. hyoint</i>	GAAGAACCUUACCGGGUUGAUUCCUUAAGAUUACCUUAGAGAUAGAUNGUG-CUUGUUUACAGAAUUUAGUGACAGGU	
<i>C. spu torum</i>	GAAGAACCUUACCGGGUUGAUUCCUUAAGAUUACCUUAGAGAUAGAAGAGUG-UCUGCUUCGAGAAUGUUUAGAGACAGGU	
<i>C. cryaero</i>	GAAGAACCUUACCUUGACUUGACAUUAGAUAGACUUBUCAGAGAUAGAAGAGUG-UCUGCUUCGAGUWACUUAUUUAGACAGGU	
<i>Thiovulus</i>	GAAGAAACCUUACCUUACCUUAGAUUAGAUAGAAUUCUUGCAGAGUUGAAGUG-CU---UUCG--GGACUUGAAGAAACAGGU	
<i>H. succino</i>	GAAGAACCUUACCGGGUUGACAUUAGAUUCCUUAAGAUUAGAGAUUAGGAGUG-CCAGUUCUUGAGGACUUCUAAAACAGGU	
<i>F. rappini</i>	GAAGAACCUUACCUUAGCGUUGACAUUAGAUUAGAUUCCGCUUAGAGAUAGUGCAGUG-CUUGCUUUGCCAGACCUUCAAACACAGGU	
<i>C. ovleri</i>	GAAGAACCUUACCUUAGCGUUGACAUUAGAGAUUCCGCUUAGAAUAGUGCAGUGUUCUAGCUUUCUAGACCUUCAAACACAGGU	

説明 微生物の説明および配列の表記法は表2Aお

よび2Dと同じであるが、次の説明を追加する：

C.spurorum=Campylobacter spurorumのbubulus  
ら亜種ATCC33562。オリゴヌクレオチドプローブ  
のいくつかは一方の末端または両方の末端に小文  
字cをもっている。これは種々の“検出”リガンド  
(例えば、ビオチン、フルオレセイン)を容易に  
結合することができる“類似体c”残基を示す。  
それらは他の点でプローブの挙動に影響を及ぼす  
ことはない。直接合成により類似体cを3末端に  
付加する場合、初めに便宜上T残基がしばしばカ  
ッピングされる。そのT残基はそれがプローブ  
とターゲット配列とのハイブリダイゼーションに  
必ずしも関与しないという点で、“厳密な意味”  
でプローブの不可欠な部分ではない。

表 2 D:カンピロバクタ-16S rRNAのブロープターゲット部位1424-1489

[illegible]

## 特開平2-84200 (18)

説明 微生物の説明および配列の表記法は表2A、  
2Bおよび2Cと同じであるが、次の説明を追加する：  
C.jejuni 4 = CAMPHERG、多数のC.jejuni株からの  
16S rRNA部分的逆転写配列の混成物 (Lau ら、  
Systematic & Appl. Microbiol., 1987、9 : 231  
~238)。C.hyooint配列中のCGジスクレオチドをは  
きむかっこは、これらの2つのヌクレオチドを同  
定するバンドがシーケンシングゲル上をやや変  
則的に泳動したことを示す。

表3：サイトドットハイブリダイゼーション

菌 株	菌株	供給源	ハイブリダイゼーション							
			ブローブ 732	ブローブ 999	ブローブ 1104	ブローブ 1105	ブローブ 1130	ブローブ 1132	ブローブ 1133	ブローブ 1134
C.jejuni	29428	(1)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.jejuni	33560	(1)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.jejuni	N933	(2)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.jejuni	N941	(2)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.jejuni	R1227	(2)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.coli	33559	(1)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.coli	04-29	(3)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.coli	P1077	(2)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.laridis	35223	(1)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.laridis	11253	(1)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.laridis	UA487	(4)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.laridis	UA577	(4)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.laridis	UA603	(4)	+	+	+	+	+	+	+	+
C.spp. (62 単離物)	臨床	(2, 3, 4)	62+	62+	58+	62+	62+	62+	62+	62+
C.fetus fetus	33246	(1)	+	+	—	+	+	+	+	—
C.fetus venerealis	33561	(1)	+	—	—	+	+	+	+	—
C.hyointestinalis	35217	(1)	+	—	—	+	+	—	—	—
C.hyointestinalis	UA625	(4)	+	+	+	+	+	+	+	—
C.concissus	33237	(1)	+	+	+	+	+	—	—	+
C.mucosalis	43264	(1)	+	—	—	+	—	—	—	—
C.sputorum	33562	(1)	—	—	+	+	+	—	—	—
C.cinaadi	35683	(1)	—	+	+	+	+	—	—	+
C.fennelliae	35684	(1)	—	—	+	+	—	—	—	—
C.pyloori	43504	(1)	—	—	—	+	—	—	—	—
C.cryaerophila	43157	(1)	—	—	—	+	—	—	—	—
C.nitrofigilis	33309	(1)	—	—	—	+	—	—	—	—
C.fecalis	UA689	(4)	+	—	+	+	+	+	+	—
C.fecalis	33790	(1)	—	+	—	+	—	—	—	—
Bacterioides gracilis	33236	(1)	—	—	—	+	—	—	—	—
B.ureolyticus	33387	(1)	+	—	—	+	—	—	—	—
Molinitella recta	33238	(1)	+	—	—	+	—	—	—	—
H.curva	35224	(1)	+	—	+	+	—	—	—	—
H.succinogenes	25943	(1)	—	—	—	+	+	—	—	—
Pseudomonas aeruginosa	1G928	(5)	—	—	—	—	—	—	—	—
Escherichia coli	N99	(5)	—	—	—	—	—	—	—	—
Salmonella typhimurium	23566	(1)	—	—	—	—	—	—	—	—

## 特開平2-84200 (19)

説明 それぞれの菌株のサイトドットによるハイブリダイゼーションは各プローブを陽性(+)または陰性(-)としておおざっぱにふりわけた。陽性信号は最強(すなわち、C.jejuni、C.coliおよびC.laridis 株)から変動(例えば、非-jejuni、coliまたはlaridis カンビロバクター株)または微弱(すなわち、非カンビロバクター)まで変化する。62の臨床単離物は全てを種レベルまで決定したわけではない。恐らく大部分はC.jejuni、C.coliまたはC.laridis 株である。

掲載した細菌株の供給源は次の通りである：

- (1) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (メリーランド州ロックビル)
- (2) マサチューセッツ大学、メディカルセンター (マサチューセッツ州ウスター)、Gary Doern
- (3) VAメディカルセンター (コロラド州デンバー)、H.J. Diener
- (4) バーモント保健省 (バーモント州バーリントン)、Tanya Sanders

(5) GTS インナーハウス単離物

代理人 弁理士 湯浅 恭三  
(外4名)



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 15/12  
C 12 Q 1/04  
//C 12 N 1/20  
C 12 R 1:01

6807-4B

- |      |               |   |
|------|---------------|---|
| ⑦発明者 | レイ・エイ・マクミラン   | アメリカ合衆国マサチューセッツ州01545, シュリユースバリー, ブルックデール・サークル 14   |
| ⑦発明者 | デービッド・ジェイ・レーン | アメリカ合衆国マサチューセッツ州01757, ミルフォード, オリオレ・ドライブ 9          |
| ⑦発明者 | マーク・エル・コリンズ   | アメリカ合衆国マサチューセッツ州01520, ホールデン, マルデン・ストリート 435        |
| ⑦発明者 | ジェームス・イー・アウエル | アメリカ合衆国マサチューセッツ州02056, ノーフォーク, ローレンス・ストリート 35       |
| ⑦発明者 | アヨーブ・ラシュチャン   | アメリカ合衆国メリーランド州02879, ガイザーズバーグ, チューリップ・グローヴ・ロード 9121 |